

⑫ 公開特許公報(A) 平1-171489

⑮ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑯ 公開 平成1年(1989)7月6日

C 12 N 15/00
A 61 K 39/205
C 07 H 21/04
C 12 P 21/02
/(C 12 P 21/02
C 12 R 1:91)
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:865)

A-8412-4B
7252-4C

C-6712-4B

C-

C-

審査請求 未請求 発明の数 1 (全18頁)

⑰ 発明の名称 狂犬病ウイルス糖蛋白質をコードする遺伝子断片およびこれを用いた狂犬病ウイルス糖蛋白質の製法

⑱ 特 願 昭62-330896

⑳ 出 願 昭62(1987)12月26日

㉑ 発 明 者 坂 本 信 一 熊本県菊池郡西合志町須屋2033-11

㉒ 発 明 者 井 手 敏 雄 熊本県菊池郡西合志町須屋2738-64

㉓ 発 明 者 時 吉 幸 男 熊本県熊本市若葉3丁目14-19

㉔ 発 明 者 山 元 通 孝 熊本県菊池郡合志町栄2127-20

㉕ 出 願 人 財団法人化学及血清療法研究所 熊本県熊本市清水町大窪668番地

㉖ 代 理 人 弁理士 筒 井 知

明 細 書

1. 発明の名称

狂犬病ウイルス糖蛋白質をコードする遺伝子断片およびこれを用いた狂犬病ウイルス糖蛋白質の製法

2. 特許請求の範囲

(1) 狂犬病ウイルスの糖蛋白質をコードする下記の塩基配列、もしくはこれと等価の塩基配列の全部、またはその一部を含む遺伝子断片。

10 20 30 40
ATG GTTCCGC AAGCTCTTCT GCTTG TACCC ATTCTGGGTT
50 60 70 80
TTTCCTCGTG TTTCGGGAAA TTCCCTATTT ACACGATACC
90 100 110 120
AGACACACTT GGTCCCTGGA GCCCGATCGA TATACATCAT
130 140 150 160
CTCAGTTGCC CAAACAATTT GGTGTAGAG GACGAAGGAT
170 180 190 200
GCACCAAGCT GTCAGGGTTC TCCTACATGG AACTTAAAGT
210 220 230 240
TGGACACATC TCAGCCATAA AGGTGAACGG GTTCACTTGC
250 260 270 280
ACAGGCCGTTG TAACAGAGGC AGAAACCTAC ACTAACTTTG
290 300 310 320
TTGGTTATGT CACCACCCTT TTCAAAAGAA AGCATTTCCG

330 340 350 360
CCCAACACCA GATGCTTGTA GAGCTGCGTA CAACTGGAAG
370 380 390 400
ATGGCCCGTG ACCCCAGATA TGAAGAGTCT CTACACAGTC
410 420 430 440
CGTACCCTGA CTACCATTTG CTTCGAACTG TAAAAACAC
450 460 470 480
AAAGGAGTCC CTCGTTATCA TATCTCCAAG TGTGGTAGAT
490 500 510 520
TTGGACCCAT ATGACAACTC CCTTCACTCG AGGGTCTTCC
530 540 550 560
CTAGCGGAAA GTGCTCAGGA ATAACAGTAT CTTCTGTCTA
570 580 590 600
CTGCTCAACT AACCACGATT ACACCGTTTG GATGCCTGAA
610 620 630 640
AGTCTGAGAC TAGGGACATC TTGTGACATT TTTACCAATA
650 660 670 680
GTAGAGGGAA GAGAGTATCC AAGGGGAGCA AGACCTGTGG
690 700 710 720
CTTTGTAGAT GAAAGAGGCC TATATAAGTC TCTAAAAGGC
730 740 750 760
GCATGCCAAC TCAAGTTGTG TGGAGTTGCT GGACTTAGAC
770 780 790 800
TTATGGACGG AACATGGGTC GCGATGCAGA CATCAATGA
810 820 830 840
GACCAATGG TGTCTCCCG ATCAGTTGGT TAATCTGCAC
850 860 870 880
GACCTTCGCT CAGATGAAAT CGAGCATCTT GTTATAGAGG

```

      890      900      910      920
AGTTGGTCAA GAAAAGAGAG GAGTGTCTGG ATGCATTAGA

      930      940      950      960
GTCCATCATA ACCACCAAGT CAGTGAGTTT CAGACGCTCTC

      970      980      990     1000
AGTTATTTAA GAAAACCTGT CCCCAGGTTTC GGAAGGAGCAT

      1010     1020     1030     1040
ATACCATATT CAACAAGACC TTGATGGAGG CTGAAGCTCA

      1050     1060     1070     1080
CTACAAGTCA GTCAGGACTT GGAATGAGAT CATCCCCCTCA

      1090     1100     1110     1120
AAAGGATGTT TGAGAGTTGG AGGGAGGTGT CATCCTCATG

      1130     1140     1150     1160
TAAACGGGGT GTTTTCAAT GGTATAATAT TAGGGCCTGA

      1170     1180     1190     1200
CGGTGATGTT TTAATCCAG AGATGCAATC ATCCCTCCTC

      1210     1220     1230     1240
CAGCAACATA TAGAGTTATT GGAATCCTCA GTTATTCCCC

      1250     1260     1270     1280
TGATGCACCC CCTTGACAG CCGTTCACAG TTTTCAAGGA

      1290     1300     1310     1320
CGGCGATGAG ACTGAGGATT TTATAGAAGT TCACCTTCCC

      1330     1340     1350     1360
GATGTGCACG AACAAGTCTC AGGGGTTGAC CTGGGTCTCC

      1370     1380     1390     1400
CGAACTGGGG GGAGTATGTA TTAATAAGTG CAGGGACCTT

      1410     1420     1430     1440
GATTGCCTTG ATGTTGATAA TTTTCCTAAT GACATGTTGT

```

```

      1450     1460     1470     1480
AGAAAAGTCG ATCGGCCAGA ATCTACACAA CGCAGTCTCA

      1490     1500     1510     1520
GAGGGACAGG AAGGAATGTG TCAGTCACCT CCCAAAGCGG

      1530     1540     1550     1560
GAAATTCATA CCTTCATGGG AGTCGTATAA AAGTGGGGGT

      1570
GAGACTGGAC TGTGA

```

(2) 該遺伝子断片が、上記の遺伝子配列の58番目のアデニンから1575番目のアデニンまでの塩基配列を含む遺伝子である前記第(1)項記載の遺伝子断片。

(3) 前記第(1)項に記載の遺伝子断片を真核細胞内で発現させることにより得られた組換え狂犬病ウイルス糖蛋白質。

(4) 真核細胞内で機能することが可能なプロモーター下流に、前記第(1)項に記載の遺伝子断片を組み込んだシャトルベクターを真核細胞中に導入し、この形質転換細胞を培養することにより狂犬病ウイルス糖蛋白質を該細胞の細胞質内に産生させることを特徴とする狂犬病ウイルス糖蛋白質の製法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、狂犬病のワクチンや診断試薬に有効な狂犬病ウイルス糖蛋白質に関するものであり、さらに詳細には、狂犬病ウイルスの糖蛋白質をコードする遺伝子断片、およびこの遺伝子断片を用いて発現された組換え狂犬病ウイルス糖蛋白質、さらにその狂犬病ウイルス糖蛋白質の製法に関する。

発明の背景

狂犬病は最も古くから人類に知られていた病気の一つであり、全ての哺乳動物について、感染発症した場合には、ほぼ100%死亡するという極めて危険な人畜共通伝染病である。

我が国は島国であるという好条件に恵まれたことと、本病の人への主たる伝播者である犬を対象に狂犬病予防法が制定され毎年予防注射が実施されてきたことにより、1957年にはついに本病の根絶に成功した。以来、今日まで1/4世紀以上の長期間にわたり、本病の発生のない、世界でも数少ない狂犬病根絶国となっている。しかしながら、わが国のように狂犬病の根絶された国は珍しく、

世界にはまだ流行が続いており、1982年のWHOの統計によるとベトナム、タイ、フィリピン、インド、ブラジルおよびエクアドルなどにおいて狂犬病の流行が多く、インドだけでも年間5万人に及ぶ狂犬病の死者がいると推測されている。また、日本においても、狂犬病の問題は完全に無くなったわけではなく、東南アジアを中心とした海外渡航者等にとって、狂犬病に対するワクチン接種は依然として重要な予防接種として取り扱われている。

狂犬病ワクチンを歴史的に振り返ると、フランスのパスツール研究所による減毒ワクチンに始まり、その後哺乳動物の脳を材料とした不活化ワクチンやそれらの部分精製ワクチンへ、さらに哺乳動物や鳥類の培養細胞を用いた細胞培養によるワクチンへと改善されてきている。しかしながら、これらはいずれもいわゆる第一世代ワクチンであり、安全性及び生産性等においてまだ問題を残している。

今日の日本における、狂犬病撲滅に大きく貢献

した動物用及び人体用のワクチン株は、西ヶ原株(系)と呼ばれる株であり、このウイルス株は、フランス国パスツール研究所で作出された狂犬病ウイルスパスツール固定毒が家兎継代における潜伏期が5〜6日であったものを、日本国農務省西ヶ原獣疫調査所に於て、近藤らが幼若モルモットと家兎を交互に継代し、継代数約90代で潜伏期を当時最短の3〜4日に短縮させたものである。(獣疫調査所研究報告第1号 大正7年(1918年)11月発行)。

また、これまでに知られている他の狂犬病ウイルス株としては、ERA株、CVS株、PV株等が代表的なウイルス株として挙げられる。これらの狂犬病ウイルスは、共通した構造として、L、G、N、M1、M2の5つの蛋白質より構成されていることが確認されており、今日においては、これらのウイルス構成蛋白質の中で、糖蛋白質であるG蛋白質が有効なワクチン材料となることが知られている[Viktor ら、J. Immunol. 110, p269-276 (1973)]。最近、狂犬病ウイルスの各々

の構成蛋白質に対するモノクローナル抗体が作出され、これまで明らかでなかった狂犬病ウイルス株間の比較が可能となってきた。FLAMANDら(J. Gen. Virol., 48, 105~109(1980))は、数多くの狂犬病ウイルスの中和抗体産生能や感染防御に關与しているG蛋白質をモノクローナル抗体を用いて比較し、G蛋白質に対する抗原決定基が少なくとも14種以上あることや、これらの一連の反応パターンから狂犬病ウイルス株間の区別が可能であることを示している。その後、多くの研究者がN蛋白質に対するモノクローナル抗体の一連のパネルを用いて世界各地で分離された街上毒ウイルスの抗原性を調べた。その結果、分離地域や分離動物ごとにウイルスの抗原性状が異なっている場合の多いことが分かっている。このような事実は、ある意味では、一つのワクチン株で世界中の狂犬病を予防し得るかという点に重大な問題を提起していると言えるが、本発明における狂犬病ウイルス株は西ヶ原株に由来し、先にも述べたように、我が国の狂犬病根絶という歴史的事実によりその

優位性が証明されているものである。

従来技術

これまでに、遺伝子組換え技術を用いた狂犬病ウイルス蛋白質の発現に関しては、G蛋白質を模倣にしたものを中心として、既にいくつか報告されている。例えば、L. T. Lavence らは、狂犬病ウイルスERA株の糖蛋白質をコードする遺伝子は大腸菌(*Escherichia coli*)の発現系に導入しその発現を試みている。その結果、糖蛋白質遺伝子は大腸菌内で発現はしたものの、宿主が大腸菌であるために糖鎖の付加はなく、免疫原として有効な抗原は得られなかったことを報告している[Vaccine 84, p203-208 コールド・スプリング・ハーバー研究所(Cold Spring Harbor Laboratory)編]。また、同様に大腸菌を用いての狂犬病ウイルス糖蛋白質発現実験が、E. Yelvertonらによっても報告されている(Science Vol. 219 p841-819 (1983))。この報告においても、ワクチンとして有効な抗原が得られたような結果は示されていない。その後、さらに進んで、真核細胞である酵母や動物

細胞を用いてG蛋白質の発現を行った例が特許公表公報として報告されている(特許公表公報昭 61-500949)。この報告においては、糖鎖が付加したG蛋白質が発現されたことが記載されているが、実際に動物を用いて免疫試験を行った結果等は示されていない。

上記の報告のように、G蛋白質の発現にはいくつかの報告において成功しているものの、実用化レベルにおけるこれらを用いた有効な狂犬病ワクチンが開発された例はまだ報告されていない。

発明の目的

このような状況において、本発明者らは、現存の第1世代の狂犬病ワクチンに優る、遺伝子組換え技術を応用した安全かつ有効なワクチン開発を目的とし、鋭意探究を重ねた結果、目的の狂犬病糖蛋白質を遺伝子組換え技術により得ることに成功した。すなわち、狂犬病ウイルス西ヶ原株に由来するウイルス株のG蛋白質をコードするcDNAをクローニングし、これを真核細胞発現ベクターに組込み、真核細胞内で発現させたところ、

真核細胞に目的の狂犬病ウイルス糖蛋白質を発現させることに成功し、さらに発現された糖蛋白質がワクチンとして有効であることを確認し本発明を完成するに至った。さらに本発明における遺伝子組換え技術を用いた狂犬病ウイルス糖蛋白質の製法によれば、目的の糖蛋白質は、形質転換細胞の細胞膜に結合した状態ではなく、細胞質内に存在する状態で発現され、形質転換細胞の代謝にほとんど影響を及ぼすことなく、効率的に目的の糖蛋白質を発現させ、さらにこれらを容易に精製することが可能となる。このようにして得られた本発明の糖蛋白質は、狂犬病ウイルスを中和する活性を有するモノクローナル抗体と反応するばかりではなく、これを動物に免疫した場合に、狂犬病ウイルス中和活性を有する抗体をも産生させることができ、本発明の糖蛋白質がワクチンや診断試薬の利用に適していることが確認された。

発明の構成および効果

本発明に用いる狂犬病ウイルス株は、前述した西ケ原株に由来し、その後家兎細胞により安定に

維持され、現在に至るまで継代数 2,000代を越しているウイルス株であり、本明細書中においては、便宜上、N・H L株と呼ぶことにする。

本発明の狂犬病ウイルスG蛋白をコードする遺伝子断片(G-cDNA)は、第1図に示した塩基配列のうち、翻訳開始コドンであるATGから終止コドンであるTGAまでの1575塩基対を有する遺伝子断片もしくはこれと等価の遺伝子配列を有する遺伝子断片、またはこれらの遺伝子断片のうち、実質的に抗原決定部位をコードする一部の遺伝子を含む遺伝子である。

本発明のG-cDNAは、狂犬病ウイルスN・H L株から、通常の遺伝子クローニング技術〔例えば、Gubler と Hoffman の方法; Gene 25, p263-269 (1983)]を用いることによりクローニングすることができる。このような狂犬病ウイルスN・H L株のG-cDNAを組込んだプラスミドを持つ大腸菌は、Escherichia coli DH5 α /pUC-M913; 機工研発第1631号(FERM BP-1631)として本発明者らにより寄託されている。また、このような

G-cDNAは、第1図の塩基配列を基にDNA合成機(例;アプライドバイオシステム社製、タイプ381A)を用いて目的の1575塩基対もしくはその一部の必要な遺伝子を合成することにより得ることもできる。このG-cDNAは、適当な発現ベクターに組込み、これを真核細胞に導入することにより目的の狂犬病ウイルスG蛋白を細胞質内に発現させることが可能な遺伝子である。

本発明のG-cDNAを発現させる場合には、その発現宿主として真核細胞が用いられる。真核細胞としては、酵母菌、または哺乳類動物由来の動物細胞もしくは昆虫細胞由来の培養細胞を用いることが可能である。発現系の構築方法としては、まず、用いた宿主細胞に応じた発現ベクターを構築し、これを宿主細胞に導入することにより目的のG蛋白発現形質転換細胞が得られる。以下、宿主細胞として酵母を用いた場合、培養細胞を用いた場合に応じて、それぞれ詳細に記述する。

酵母を宿主として用いる場合には、酵母の遺伝子と大腸菌の遺伝子を担い、さらに適当なプロモ

ーター領域を担ったシャトルベクターに該G-cDNAを組込むことが好ましい。そのようなシャトルベクターとは、酵母の複製開始点、例えば2 μ oriならびに/もしくはarsI、酵母における選択マーカーとなる遺伝子、酵母由来のプロモーター領域、大腸菌の複製開始点領域(例えばpBR322由来のori領域)、および大腸菌での選択マーカー遺伝子を持つプラスミドである。ここで言う酵母の選択マーカーとは、例えば、ロイシン、ヒスチジン、またはトリプトファン等のアミノ酸産生遺伝子であり、大腸菌での選択マーカーとなる遺伝子とは、アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、またはクロラムフェニコール等の耐性遺伝子を指す。酵母由来のプロモーターとは、酵母菌体内で作用することが可能な形質発現調節領域を指し、例えば抑制性酸性フォスファターゼ(PH05)プロモーター、グルタルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAP-DH)プロモーター等が好ましいものとして挙げられる。このようなシャトルベクターの好ましい一例としては、酸性フォスファ

ターゼ形質発現調節領域(プロモーター)を持つ pAM82(特開昭59-36699号)等が挙げられる。宿主の酵母菌としては、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) AH22(微生物研究第312号)が好ましいものとして挙げられるが、これに限定されるものではない。

上記のような酵母用発現ベクター(シャトルベクター)を用いて酵母を形質転換させる場合には、通常の酵母形質転換方法[伊藤ら、J. Bacteriol 153, p163-168 (1983)]により、目的のG蛋白発現が可能な形質転換酵母菌を得ることが出来る。

一方、培養細胞を宿主として用いる場合には、SV40ウイルス遺伝子の一部をG-cDNAと置換することにより、形質転換細胞内でG蛋白を発現することが可能な組換えウイルスを得ることができ、これをヘルパーウイルスとともに宿主細胞に導入し、目的のG蛋白を得ることができる。または、宿主細胞内でプラスミド状態で増殖できるウイルス(パピローマウイルスなど)遺伝子の一部とG-cDNAを結合させ宿主細胞に導入す

れば、プラスミド状態でG蛋白目的遺伝子を発現する細胞を得ることができる。さらに、大腸菌プラスミドにおいてG-cDNAの上流にウイルスや高等動物由来のプロモーターを結合させたプラスミドを培養細胞に導入すれば、宿主染色体に組み込まれたG-cDNAを得られた形質転換細胞で発現させることができる。このようなプラスミドとしてpSVLベクター(ファルマシア社製)などのように市販のものを利用することもできる。

上記のようにして得られたG蛋白発現形質転換体を下記のように処理することで目的のG蛋白を精製することが可能である。

まず、得られた形質転換体をその細胞に応じた培地と条件のもとに培養することにより目的のG蛋白を形質転換体の細胞質中に発現させる。宿主として、酵母を用いた場合には、超音波もしくはガラスビーズやマントンゴリーンのような物理的処理や、または必要に応じ界面活性剤のような化学的処理も加えて処理することにより集めた菌体を破壊する。一方、培養細胞の場合には、酵母の

場合のような激しい処理は必要とせず、界面活性剤で処理することにより細胞質内のG蛋白を溶出することができる。このようにして得られた破砕液(ライセート)は、遠心分離等により宿主細胞由来の沈殿物を除いた後、狂犬病G蛋白に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより目的のG蛋白質を容易に精製することができる。さらに精製を行う場合には通常の精製方法、例えばイオン交換クロマトグラフィー、密度勾配遠心種々のアフィニティークロマトグラフィー等によりワクチンとして使用可能な純度まで精製することができる。

本発明に於ける狂犬病ウイルスG-cDNA及びこれを用いて発現された組換え狂犬病G蛋白質とその発現系は、従来報告されたものに比較し、次の特徴を有するものである。

(1) 糖蛋白質(G蛋白)cDNAの塩基配列

これまでいくつかの狂犬病ウイルスのcDNA塩基配列が報告されているが、狂犬病ウイルス成蛋白質のなかの成熟G蛋白の相補的なDNA(

cDNA)の塩基配列は、1515塩基対からなり、505個のアミノ酸をコードしている。本発明の狂犬病ウイルスN・H L株のG-cDNA塩基配列をERA株、CVS株、PV株のそれらと比較すると、これらのいずれとも塩基配列が異なり、特に、糖鎖の付加が予想されるAsn-X-Thr(Ser)配列によって示される部位は明確に異なっている。その違いをまとめたものを第1表に示す。

第1表

株名	N末端からのアミノ酸番号						
	37	158	204	247	319	465	480
N・H L	○	×	×	○	○	×	○
ERA	○	×	×	○	○	○	×
CVS	○	×	○	×	○	×	○
P V	○	○	×	○	○	○	×

○:糖鎖の付加が可能な部位

×:糖鎖の付加が不可能な部位

糖の付加(グリコシレーション)の意義はよく解明されていないものの、蛋白質の構造や安定性

に参与していると考えられている。事実、生体の生理活性物質や血清蛋白等多くの蛋白が糖蛋白質である。グリコシレーションシグナルの配列の存在は必ずしも糖の付加を意味するものとは限らないが、この配列は蛋白質の構造や安定性に参与している可能性が強く、その意味では蛋白質の機能(生物学的活性)に参与することになるので、グリコシレーションサイトを比較することは、cDNA全体のホモロジーを比較することと同等に重要であると考えられる。

(2) 動物培養細胞系における発現様式

本発明による発現プラスミドを動物培養細胞、例えば COS細胞に感染させ、狂犬病ウイルスG蛋白の発現部位を、ウイルスG蛋白抗原を免疫して得たポリクローナル抗体及びウイルスを中和する活性を有するモノクローナル抗体を用いて検出した。

その結果、本発現系では、G蛋白は細胞質内に顆粒として検出され、細胞膜では検出されなかった。これまで狂犬病ウイルスG蛋白の動物細胞で

の発現様式でそのような現象の報告はなく、従って本発明における上記発現の様式は新規なものである。狂犬病ウイルスと同じラブドウイルス科に属する水泡性口内炎ウイルス(VSV)に関して、Roseらは、VSVのG蛋白cDNAを本発明の発現系とほぼ同様に構築し、その発現様式を報告している[Cell 30, p753-762 (1982)]。この報告によれば、形質転換細胞中で発現された特異抗原は細胞膜に結合した状態にあることが認められている。この事実、本発明におけるG-cDNA固有の機能が、G蛋白抗原の細胞質内局在を誘導していることを示している。

発現産物が培養液中に放出される系を除けば、外来遺伝子の発現系としては、発現産物が細胞質内に発現され局在する場合と、発現産物が発現された後細胞膜に結合した状態で局在する場合に分けられる。

一般的な現象として、発現産物が細胞膜に結合すると、その宿主細胞の増殖が阻害を受けやすくなること、さらには細胞膜随伴性の蛋白(糖蛋白)

の精製において、細胞膜成分が目的の蛋白と結合して、品質や回収率に大きな影響を及ぼす等が考えられる。従って、本発明の狂犬病ウイルスG蛋白発現系は、目的のG蛋白を細胞質内に発現させることができるため、このような発現効率や精製における問題を伴わず、目的のG蛋白を非常に効果的に発現させ、さらに精製することが可能である。

(3) 発現されたG蛋白質による中和抗体の産生

本発明のように、遺伝子組換えにより外来遺伝子を酵母や培養細胞を用いて発現させる場合には、発現されたペプチドが、目的のペプチド(抗原)に対する抗体と反応はしても、すなわち、発現されたペプチドに抗原性はあっても、生物学的製剤としての性質に欠けているという場合が少なくない。これは、宿主として用いる細胞において、翻訳された後のペプチドが生物活性を持つように修飾されるかどうかによるものと思われる。前にも示したように、E. Yelvertonらは、大腸菌(E. coli)を用いて、狂犬病G蛋白の遺伝子を発現させ

ることに成功し、これがG蛋白質に対する抗体と反応することは確認できたが、これを動物に免疫した場合には抗体を産生させることはできなかったことを報告している。このことは大腸菌に糖鎖を付ける等の修飾機能がないことが最も大きな原因であると推察されるが、真核細胞である酵母や、培養細胞を用いた場合にも発現物質の生物活性に関する同様の問題が生じることが少なくない。これは、発現されるペプチドが宿主細胞に対してどのような影響を与えるか、または、発現されたペプチドが本来の生物活性を有するように修飾されるかどうかというような様々な要素が係わるものと推測され、言い換えれば、発現を目的として宿主に導入される目的ペプチドの構造遺伝子に応じて微妙に影響を受けるものであると言えよう。しかしながら、本発明のG-cDNAを真核細胞に導入し発現され、得られるG蛋白は、G蛋白に対する抗体と反応するだけでなく、これをワクチンとして動物に注射した場合に狂犬病ウイルスに対して中和活性のある抗体を誘導することが可能で

あることが、モルモットを用いた免疫試験により確認された。さらにその免疫原性の強さを狂犬病ウイルス由来の精製 G 蛋白質と比較したところ、同等の結果を示した。このことは、本発明の G 蛋白質がワクチンとして十分に有効であることを示しており、遺伝子組換えにより安価でしかも大量に調製されることが可能な本発明の G 蛋白質を用いたワクチンが、開発途上国を中心とした狂犬病の駆逐に大いに貢献し得ることを示している。

このように、本発明の特徴は、狂犬病ウイルス G 蛋白質を細胞膜に結合させず細胞質にのみ局在させ発現させることが可能であること、またこのようにして得られた狂犬病 G 蛋白質はウイルスに対する中和抗体を産生させることが可能であるという点にある。

以下、実施例に従って、本発明をさらに詳細に説明する。

各実施例において特に断わりがない限り以下の試薬および方法に従った。

試薬および化学物質

ing [T.Maniatis, p150-163 (1982)] に従ったが、特にアガロースゲルより特定の DNA 断片を抽出したい時には、ローメルディングアガロース (BIO-RAD カタログ番号 162-0017) を使用し、その回収も Molecular cloning [T. Maniatis, p170 (1982)] に従った。

プラスミドの抽出・精製

形質転換した大腸菌から大量にプラスミドを抽出、精製する場合は Molecular cloning [T. Maniatis, p90-91 (1982)] 記載のアルカリ法に従った。形質転換後の数多くの大腸菌の中から、所望のプラスミドで形質転換したクローンを選定する場合、次に、述べるコロニーハイブリダイゼーションに従い目的の陽性クローンをまず選択した。そのクローンから少量のプラスミドを抽出、精製する方法として Molecular Cloning [T. Maniatis P368 (1982)] に従い、それを抽出し所定の制限酵素で切断しアガロース電気泳動によりその分析を行った。

コロニーハイブリダイゼーション・ブランクハ

制限酵素および核酸酵素は宝酒造株式会社および東洋紡績株式会社のものを使用した。

α - 32 P-dCTP はアマシャム (コード NO. P810385, 800Ci/mmol) を使用した。

DNA の切断・修飾およびライゲーション

各酵素の使用条件はパンフレット "Takara Reagents for Genetic Engineering Research" 及び "TOYOBO 遺伝子工学研究用試薬総合カタログ" の指定する条件に従った。各酵素反応終了後は、Molecular cloning [T.Maniatis p458-459, (1982)] に従い、フェノール処理、クロロホルム処理を行いエタノール沈澱により DNA を回収した。DNA ライゲーション反応は、タカラライゲーションキット (宝酒造、カタログ番号 8021) を使用し、それに添付のプロトコールに従った。また、DNA 末端へのリンカーの付加もこのキットを使用し、それに添付のプロトコールの指示する方法により行った。

アガロース電気泳動による DNA 断片の回収

DNA アガロース電気泳動は Molecular cloning

イブリダイゼーション

G-c DNA 断片をニックトランスレーション試薬キット (BRL カタログ No. 8160S8) と、標識する基質としてピオチン-11-UTP (BRL カタログ No. 9507SA) を用い、キットに添付されているプロトコールに従いプローブを調製した。コロニーブランクハイブリダイゼーションの条件等は藤多等が細胞工学 Vol. 4, No. 10, P893-900, (1985) で述べている方法に準じて行なった。

実施例 1: G-c DNA の調製

(1) RNA の抽出

37℃、48時間増殖させたハムスター肺細胞 (H m L u 細胞) に、moi 0.2 で狂犬病ウイルス N・H L 株を感染させた。48時間後に、その細胞より全 RNA を Molecular Cloning [T.Maniatis, p196 (1982)] に従い、抽出した。

分光学的な定量法 (260nm の吸光度が 1.0 の時、40 μ g/ml) により、ローラーボトル 1 本分の狂犬病ウイルス感染細胞より 1.5mg の RNA を得た。このようにして得た RNA が分解していないことを

確認するために、その中から2 μ gを取りP.Tomasの方法 [Proc. N.A.S. 77 p5201-5205 (1980)] に従い、電気泳動を行った。その結果、その中の大部分は28s及び18sリボソームRNAであったが、それらが分解を受けていなかったことから、その中に少量含まれるG-mRNAも分解を受けていないことが予測された。

次に、P.Tomasの方法に従い電気泳動を行ったRNAをニトロセルロース (Schleicher & Schuell 8A85) にトランスファーし、³²Pで標識した狂犬病ウイルスHEP-Flury株Gタンパク質cDNA断片をプローブとしてニトロセルロース上でハイブリダイゼーション (ノーザンブロッティング) を行なった。その結果、同時に泳動したウイルス非感染HmLu細胞から抽出したRNAには、全くバンドを見いだせず、ウイルス感染細胞から抽出したものには2.2kbp付近、およびこの幾分高分子の位置にバンドを見出すことができた。以後、このRNAをcDNA合成に供した。

(2) 狂犬病ウイルスN-HL株のGタンパク質cD

k⁻、mk⁺)、supE44、thi-1、 λ -recA1、gyr96、relA1、 ϕ 80dlacZ Δ H15) のコンピテントセルに感染させた。次に、狂犬病ウイルスヘッパフラリー (HEP-Flury) 株Gタンパク質cDNA断片をプローブとし、このようにして得られたクローンのうち約3,000クローンをコロニーハイブリダイゼーションで調べた結果、1クローンが発色し、これをpUC-RNSLと命名した。『G蛋白質発現系の構築』の項で述べるような操作を加えたこのcDNAを、COS細胞及び酵母の発現系に導入した。

② 長田ら、実験医学 Vol.4、No.8、87-92(1986)に記載している方法に従い、まず2本鎖cDNA 0.5 μ gをEcoRI-メチラーゼで処理し、EcoRI切断部位をメチル化後、宝酒造ライゲーションキットによりそのDNAの両端にpEcoRIリンカーを付加した。そのDNAをクローニングする為、既にEcoRIで切断されている λ gt10のフームをストラテジーン社 (STRATAGENE) (GT10) より購入し、そのパンフレットに記載されているプロトコール

NAのクローニング

cDNA合成は、GublerとHoffmanの方法 [Gene 25, p263-269 (1983)]、つまりオリゴdT₁₂₋₁₈ (ファルマシア社製) をプライマーとし、ウイルス感染細胞から抽出したRNA 5 μ gを鋳型として、逆転写酵素 (Molony murine Leukemia Virus Transscriptase; BRL社製) により合成した一本鎖cDNAとハイブリダイズしているRNA鎖に、大腸菌RNaseHによってニツクを導入し、それで形成させたRNA鎖をプライマーとして、大腸菌ポリメラーゼIにより二本鎖cDNAを合成した。このようにして合成した二本鎖cDNAを次の2つの方法によりクローニングした。

① 宝酒造ライゲーションキットを用い、両端にpSalIリンカーを付加した2本鎖cDNAと、制限酵素SalIで切断後、その5'末端のリン酸を除去したクローニングベクターpUC19の両者を宝酒造ライゲーションキットの添付プロトコールに従い反応 (16℃、30分間) させた。これをBRLから市販されているDH5 α (F⁻、endA1、hsdR17 (r

に従いそれらDNAをライゲーションさせた。次にストラテジーン社より市販されているインビトロパッケージングエクストラクト (商品名: Giga-pack puls ストラテジーン社製) 及びそれに添付の宿主菌VCS258、もしくはC600hflを用いたインビトロパッケージ法によりG-cDNAをクローニングした。総数で約35万個のクローンを得、そのうち7,000個を1枚のプレートにまき、ブランクハイブリダイゼーションの結果から21個の陽性クローンを得た。

(3) pRNSL全塩基配列決定

G-cDNA断片を得るために、20 μ gのpRNSLを制限酵素SalI 50単位と、それに添付のバッファーを用い、37℃、4時間反応させた。そのDNAを1%ローメルティングアガロースにより2つの断片にわけ、2.1kbpに相当するG-cDNA断片を抽出、回収した。

① このG-cDNAをより小さく断片化するために、0.1 μ g G-cDNAを4塩基認識の制限酵素HaeIII、RsaI、AluI、TagI、Sau3AIで各々6

, 5, 6, 9, 7個の断片に分断した。その断片化 G-c D N Aのうち Hae III, Rsa I, A1u I 切断 G-c D N Aについては Sma I で切断した M13mp18もしくは Sma I と Sal I で切断した M13mp19と、Taq I 切断フラグメントは Acc I で切断した M13mp18と、また Sau3 A I 断片の場合は Bam H I、もしくは Bam I と Sal I でダブルに切断した M13mp19と各々、宝酒造 D N Aライゲーションキットで、ライゲーションさせた。

② 制限酵素 Kpn I と Bam H I で切断した p U C - R N S L を宝酒造キロシーケンス用デリーションキット (カタログNo.6030) と、それに添付のプロトコールに従い、Bam H I 切断部位からデリーションさせ、その程度の異なる G-c D N Aを調製した。次にこれを Sal I で切断した。このようにして得たデリーション G-c D N Aを Sma I と Sal I で二重切断した M13mp18を、タカラライゲーションキットを用い、ライゲーションさせた。

東洋紡インストラクションマニュアルの方法に従い、JM101のコンピテント細胞を調製し①、②の処理で得た D N Aでコンピテント細胞を形質転換

させた。その形質転換の手順およびその後一本鎖 D N Aの抽出、精製はすべて東洋紡 M13 クローニングキット (コードNo.M13-001) とその“インストラクションマニュアル”に従い行った。このようにして得た一本鎖 D N Aは、東洋紡 M13 シークエンシングキット (コードNo.M13-003) と B R L 電気泳動装置 (モデル S2 カタログNo.1105) を用いた B R L シークエンシングゲル電気泳動システムとそれに添付のプロトコールに従い行った。その結果、p R N S L は 2,123塩基対 (bp) からなり、その中にアミノ酸 524個からなる狂犬病 G 蛋白質をコードする 1,575塩基対のオープンリーディングフレームが存在することが確認された (第1図参照)。

塩基配列の結果から、クローニングした G-c D N Aの 5' 末端にはアデニンのクラスターが 32個存在することがわかった。それを S V 40 後期、および酵母酸性ホスファターゼプロモーターの下流に接合した場合、このアデニンクラスターはその転写を著しく阻害することが予想された。そこで以下に示す手順でそれを除去した。まず p U C -

R N S L 2 μ g を制限酵素 Pst I で切断 (37℃、2時間) した。その D N Aを、宝酒造ヌクレアーゼ Ba 131-S (カタログNo.2510A) により反応温度 30℃、反応時間 2分 で 下記の反応組成で消化を行った。

D N A (Pst I 切断済)	23 μ l
5x Ba131 バッファー (※)	6 μ l
Ba 131 S (2units/ml)	1 μ l

(※) 5x Ba131 バッファー; 100mM Tris-HCl, 3M NaCl, 60mM CaCl₂, 60mM MgCl₂, 5mM EDTA

この後、2 μ g pSal I リンカー (東洋紡 SAL-801) を宝酒造ライゲーションキットを用いて、このヌクレアーゼ Ba 131 消化 D N A 両端に付加した。その D N Aを制限酵素 Sal I で十分切断し、ローメルティングアガロース電気泳動により約 2.1kbp 付近のブロードとなった D N A バンドを切り出しその D N Aを回収した。その D N Aを制限酵素 Sal I で切断した p U C 19 とライゲーションキットを用いライゲーションさせ、B R L (カタログNo.8263SA) より購入したコンピテント細胞 D H 5 α を

形質転換させることでクローニングを行った。

このようにして得られたクローンの 5' 末端側の塩基配列を東洋紡 M13 クローニングキット (コードNo.M13-001) とその“インストラクションマニュアル”に従って行ない、それを決定した (第2図参照)。この中で N 9-13 を G 蛋白質 c D N Aとして、後の C O S 細胞、および酵母の発現系に導入した。この遺伝子断片を有するプラスミド p U C - N 9 13 は、大腸菌に組込まれた状態で Escherichia coli DH5 α / pUC-N913 [微工研発第 1631号 (FERM BP-1631)] として寄託されている。

実施例 2: 動物細胞を宿主とした糖蛋白質の発現

(1) C O S 細胞発現プラスミドの構築

p U C - N 9 13 を制限酵素 Sal I で切断し、インサートしている G 蛋白質 c D N Aを得るために制限酵素 Sal I でそれを切断し、2つの断片に分けた。Molecular Cloning [T. Maniatis, 170 (1982)] に記載の方法に従い、ローメルティングアガ

ローズゲル電気泳動により G-cDNA 断片を得た。

発現ベクターとして、ファルマシア社より市販されている pSVL (カタログ No. 27-4509-01) を使用した。G-cDNA をこのベクターのプロモーター下流に挿入する為に制限酵素 Xho I で切断し、その 5' 末端リン酸を除去した。次に pSVL と N9-13 G-cDNA 断片をタカラライゲーションキットによりライゲーションさせ、それを HB101 コンピテントセルに感染させた。

前記“プラスミドの抽出・精製”及び“コロニーハイブリダイゼーション”の項で述べた方法により N9-13 G-cDNA が SV40 後期プロモーターの転写の方向に挿入されたものを選定し、その 1 つである pSVL-N913 (第 3 図参照) をファルマシア社より市販されている Cell Phect Transfection Kit (カタログ No. 17-0595-01) を用いて COS 細胞に感染させた。

(2) COS 細胞での G 蛋白質発現確認

アフリカミドリザル腎由来 SV40 形質転換細胞 (COS-1) (大日本製薬より入手、カタロ

グ No. 08-1650) を、10% 子牛血清を含む MEM 培地中に細胞濃度が 10^5 cell/ml になるように調整し、37℃ で 24 時間二酸化炭素フラスコで培養した。24 時間の培養後、培地を除去し、細胞を 0.01M PBS で 1 回洗浄した。50 μ g/ml DEAE-デキストラン溶液 100 μ l と G 蛋白質発現ベクター pSVL-N913 0.5 μ g を混合したものをこの細胞に滴下し、室温に 15 分間放置して感染させた。その後、無血清 MEM 培地を用いてこの細胞を洗浄し、通常の培養条件 (37℃、5% 二酸化炭素フラスコ) で 48 時間培養した。

次に、このようにして得た細胞が G 蛋白質を発現していることを確認するために、ウイルス学実験法 (国立予防衛生研究所学友会編、p297-329) に記載されている方法に従い間接蛍光抗体法により観察を行った。すなわち、DNA 感染 48 時間後の培養上清を除去し、アセトンで洗浄することにより抗原がはげ落ちたり、溶出したりしないように前処理を行った。一次抗体として、中和抗体を持つモノクローナル抗体と前処理した細胞を反応

させた (10 分、室温)。0.01M PBS で洗浄後、蛍光色素である FITC (fluorescein isothiocyanate) で標識した抗マウス IgG (FITC-Rbx Mouse IgG(H+L)、ZYMED 社製カタログ No. 61-6511) と反応させた。これを 0.01M PBS で洗浄後、蛍光顕微鏡により観察した。このようにして観察した COS 細胞の蛍光反応の状態を第 4 図に示した。その結果、COS 細胞内で発現された G 蛋白質は細胞膜に結合した状態ではなく、細胞質内に顆粒状として発現されていることが確認された。

実施例 3: 酵母を宿主とした糖蛋白質の発現

(1) 酵母発現プラスミドの構築

pUC-N913 がインサートしている G 蛋白質 cDNA を得るため、制限酵素 Sal I でそれを切断し、2 つの断片に分けた。ローメルティングアガロース電気泳動により、G-cDNA 断片を得た。一方、酵母での発現ベクター pAMB2 (特開昭 59-36699 号参照) を、制限酵素 Xho I で切断した。その後、アルカリホスファターゼ (ペーリンガー; 製品 号 703023) を用い 5' 末端のリン酸を Mole

cular Cloning (T. Maniatis P133-134 1982) に従い除去した。このベクターと N9-13 の両者をタカラライゲーションキットを用いライゲーションさせ、これを大腸菌 HB101 のコンピテントセルに感染させた。出現した大腸菌を、G-cDNA をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションにより陽性クローン pAMN913 を得た (第 5 図)。

(2) 酵母での糖蛋白質の発現

酵母としてサッカロミセス・セレビシエ AH22 [a leu2 his4 Can1 (Cir+)] (機工研条第 312 号) を用い、これを YPD 培地 (2% ポリペプトン、1% イーストエキス、2% グルコース) 100ml に接種し、30℃ で一晩培養した後、遠心して集菌した。滅菌水 20ml にて菌体を洗浄し、ついで 1.2M ソルビトール及び 100 μ g/ml チモリアーゼ 60,000 (生化学工業製) の溶液 5ml に懸濁させ、30℃ で約 30 分間浸ち、スフェロプラスト化した。ついで、スフェロプラストを 1.2M ソルビトール溶液で 3 回洗浄した後、2 M ソルビトール、10mM CaCl₂ および 10mM Tris-HCl

(pH7.5)の溶液0.8mlに懸濁させ、その60 μ gずつを小試験管に分注した。これに前に調製した組換えプラスミドpAMN913 (10 μ g)を加えて、充分混合し、さらに0.1M CaCl₂ (3 μ l)を加えて最終濃度10mM CaCl₂とし、室温に5~10分間放置した。ついでこれに、20%ポリエチレングリコール4,000、10mM CaCl₂および10mM Tris-HCl (pH7.5)溶液1mlずつを加えて混合し、室温に約20分間放置した。この混合液0.2mlずつを45℃に保温された再生培地(22%ソルビトール、2%グルコース、0.7%イーストニトロゲンベースアミノ酸、2%YPD、20 μ g/mlヒスチジン、3%寒天)10mlに加え、軽く混合させ、予め準備された1.2Mソルビトール含有最小培地(0.7%イーストニトロゲンベースアミノ酸、2%グルコース、20 μ g/mlヒスチジン、2%寒天)プレートに重層し、固化させた後、30℃で培養してロイシン非要求性酵母のコロニーを得た。このコロニーを20 μ g/mlヒスチジンを含むバルクホルダーミニマムメデイウム〔東江ら; J. Bacterol., 113, 117~738(1973)を参照〕にて培養して形質転

換酵母サッカロミセス・セレビシエを得た。

このようにして得られた形質転換酵母のコロニーをさらに20 μ g/mlヒスチジンを含むバルクホルダーミニマムメデイウムの寒天プレート上に塗布し、30℃にて培養してコロニーを形成させた(ロイシン非要求性となった形質転換体の再確認のため)。ついでこのコロニーから菌体を分離し、20 μ g/mlヒスチジンを含むバルクホルダーミニマムメデイウム10mlに接種し、30℃にて培養を行う。約24時間後、対数増殖期にある菌体を遠心して集菌し、これをリン酸を含まない最小培地(バルクホルダーミニマムメデイウムに含まれるKH₂PO₄をKClで置換し、さらに20 μ g/mlヒスチジンを加えたもの)10mlに菌体数約4 $\times 10^8$ 個/mlになるように懸濁し、30℃にて約24時間培養を続けたのち、4000回転、10分間の遠心により菌体を集めた。

この菌体を1.2Mソルビトール、50mMリン酸緩衝液(pH7.2)、14mM2-メルカプトエタノール、100 μ g/mlザイモリエース80,000の溶液3mlに懸濁させ、30℃にて30分間ゆるやかに振とうしてスフ

エロブラスト化し、遠心分離によりこれを集めた。

このスフェロブラストを1%トリトンX-100を添加した50mMリン酸緩衝液(pH7.2)1mlに懸濁し、グラスビーズを加えて攪はんして菌体を破砕した。

この破砕液を5000rpmで10分間遠心し、上清について次のG蛋白測定法によりG蛋白抗原活性を測定した。即ち、第1抗体として、抗G蛋白モノクローナル抗体を50mM炭酸緩衝液(pH9.5)で希釈し、ELISA用96穴プレートに37℃、2時間もしくは室温4時間コートした。次にPBS(リン酸緩衝生理食塩水)/0.05%Tween20溶液(PBS-Tween)で3回洗浄し、1%BSAを含むPBS-Tween(BSA-PBS-Tween)で4℃一夜マスキングした。ついで、各々のサンプルをPBS-Tweenで適当に希釈しプレートに分注し、37℃、1時間保温した。その後、PBS-Tweenで5回洗浄し、パーオキシダーゼ標識した抗G蛋白モノクローナル抗体を含むBSA-PBS-Tween溶液をプレートに添加した後、37℃、1時間保温した。その後、PBS-Tweenで5回洗浄し、基質としてTMBZ

(テトラメチルベンジジン塩酸塩)のEDTA溶液(0.006%過酸化水素)をプレートに添加し、発色させた。発色の程度をオートリーダー(00450nm)で測定して、第2表の結果を得た。陰性対照としてG-cDNAを組み込んでいないプラスミドpAM82を用いて形質転換した形質転換酵母を用いて同様に処理したものについてのG蛋白抗原活性も同時に測定した

第2表

	pAMN913	pAM82
00450	1.7	0.1

この表から明らかなように、本発明のG-cDNAを組み込んだシャトルベクターを導入した酵母のみに非常に高いG蛋白抗原活性が検出できた。

実施例4: マウスによる免疫原性試験

(1) 免疫用抗原の調整および免疫

ウイルス中和活性を有するモノクローナル抗体

をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、pAMN913で形質転換した酵母のライセートから免疫試験に使用するためのG蛋白質を精製した。これに水酸化アルミニウムゲルを加え、1ドース1 μ gになるように調整し、免疫用抗原とした。体重450~850gのハートレー系モルモット(雌)20匹を用い、その内10匹に上記で調整した免疫用抗原を腹腔内に注射し、さらに初回注射から1週後に同様に2回目の注射を行った。残りの10匹は非免疫対照群として生理食塩水を同様に注射した。

(2) 中和試験

中和用ウイルスはHmLu-1細胞に順化され、かつ成熟マウスの脳内注射でこれを発症死させる毒性を有する狂犬病ウイルスN・H株を用いた。免疫群すべてのモルモットについて、注射前、および2回目注射2週後に採血を行った。非免疫対照群についても同様に採血を実施した。次にこれらの血清を56℃で30分間加熱非働化を行い、この血清をまず、2倍段階希釈し、その50 μ lにウイル

ス量が200TCID₅₀になるように調整したウイルス液50 μ lを37℃で90分間反応させた。次にその50 μ lづつを96穴マイクロプレートに培養させた。HmLu-1細胞に接種し、37℃で1.0時間吸を行ったのち、細胞維持用培地(イーグルMEM培地)150 μ lを加えて37℃で4日間培養を行った。培養後のプレートについて西洋ワサビペルオキシダーゼ(Horseradish Peroxidase)を標識した抗狂犬病糖蛋白モノクローナル抗体(標識抗体)を反応させた。その結果において標識抗体と反応しない血清はウイルス非感染のものであることを示し、中和抗体陽性を示す。このようにウイルス感染を完全に抑えた血清の最高希釈倍数の逆数を求め、これを中和抗体価とした。その結果、本発明のG蛋白質を免疫して得られた血清には中和抗体を有することがわかった。その結果を第3表に示した。

以下余白

第3表

免疫群			非免疫群		
モット No.	中和抗体価		モット No.	中和抗体価	
	注射前(0w)	注射後(3w)		注射前(0w)	注射後(3w)
1	<2	32	11	<2	<2
2	<2	8	12	<2	<2
3	<2	16	13	<2	<2
4	<2	64	14	<2	<2
5	<2	32	15	<2	<2
6	<2	4	16	<2	<2
7	<2	32	17	<2	<2
8	<2	84	18	<2	<2
9	<2	16	19	<2	<2
10	<2	128	20	<2	<2

(注) 0w:0週目 3w:3週目

(4) ウイルス攻撃試験

前記(2)で述べた方法に準じて2回免疫したモルモットを2回目免疫から2週間後(初回免疫から3週目)に、約10LD₅₀/0.2mlの狂犬病ウイルスCVS株を口筋内に接種(攻撃)した。対照群に対しても同様に攻撃を行った。攻撃後2週間症状の有無を観察し、無症状に経過したものを感染防御

能陽性モルモットとした。その結果を第4表に示した。

第4表

試験群	発症死数	耐過数	感染防御率
免疫群	1	9	90%
対照群	10	0	0%

その結果において本発明の狂犬病G蛋白質を免疫した群では1匹(第3表のNo.6)を除くすべてのモルモットが無症状の経過を示したが、一方の非免疫対照群はすべてのモルモットが狂犬病特有の症状を呈して死亡した。以上の成績より、本発明のG蛋白質が狂犬病のワクチンとして非常に有効であることが確認された。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明者らによりクローニングされた狂犬病G蛋白質をコードする構造遺伝子およびそ

の制配列からなる遺伝子配列およびこれから推測されるアミノ酸配列を示したものである。

第2図は、本発明の狂犬病G-cDNAの調整においてアデニンクラスターの除去を示したものである。

第3図は、COS細胞を宿主とした発現ベクターpSVL-N913の構築図を示す。

第4図は、COS細胞内で発現された狂犬病G蛋白を蛍光反応で示したCOS細胞の形態学的変化を示す写真である。

第5図は、酵母用発現ベクターpAMN913の構築図を示す。

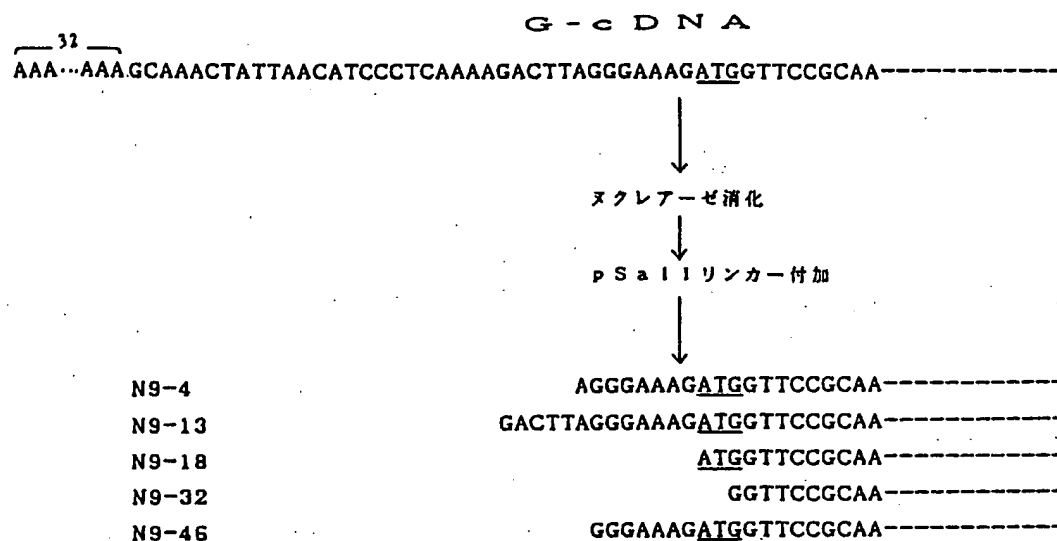
第 1 図 その 1

AA. AAA. AAA. AAA. AAA. AAA. AAA. AAA. AAA. AAA. ACT. ATT. AAC. ATC. CCT. CAA. AAG. ACT. TAG. GGA
 AAG. ATG. GTT. CCG. CAA. GCT. CTT. CTG. CTT. GTA. CCC. ATT. CTG. GGT. TTT. TCC. TCG. TGT. TTC. GGG
 Met-Val-Pro-Gln-Ala-Leu-Leu-Leu-Val-Pro-Ile-Leu-Gly-Phe-Ser-Ser-Cys-Phe-Gly
 AAA. TTC. CCT. ATT. TAC. ACG. ATA. CCA. GAC. ACA. CTT. GGT. CCC. TGG. AGC. CCG. ATC. GAT. ATA. CAT
 Lys-Phe-Pro-Ile-Tyr-Thr-Ile-Pro-Asp-Thr-Leu-Gly-Pro-Trp-Ser-Pro-Ile-Asp-Ile-His
 CAT. CTC. AGT. TGC. CCA. AAC. AAT. TTG. GTT. GTA. GAG. GAC. GAA. GGA. TGC. ACC. AAC. CTG. TCA. GGG
 His-Leu-Ser-Cys-Pro-Asn-Asn-Leu-Val-Val-Glu-Asp-Glu-Gly-Cys-Thr-Asn-Leu-Ser-Gly
 TTC. TCC. TAC. ATG. GAA. CTT. AAA. GTT. GGA. CAC. ATC. TCA. GCC. ATA. AAG. GTG. AAC. GGG. TTC. ACT
 Phe-Ser-Tyr-Met-Glu-Leu-Lys-Val-Gly-His-Ile-Ser-Ala-Ile-Lys-Val-Asn-Gly-Phe-Thr
 TGC. ACA. GGC. GTT. GTA. ACA. GAG. GCA. GAA. ACC. TAC. ACT. AAC. TTT. GTT. GGT. TAT. GTC. ACC. ACC
 Cys-Thr-Gly-Val-Val-Thr-Glu-Ala-Glu-Thr-Tyr-Thr-Asn-Phe-Val-Gly-Tyr-Val-Thr-Thr
 ACT. TTC. AAA. AGA. AAG. CAT. TTC. CGC. CCA. ACA. CCA. GAT. GCT. TGT. AGA. GCT. GCG. TAC. AAC. TGG
 Thr-Phe-Lys-Arg-Lys-His-Phe-Arg-Pro-Thr-Pro-Asp-Ala-Cys-Arg-Ala-Ala-Tyr-Asn-Trp
 AAG. ATG. GCC. GGT. GAC. CCC. AGA. TAT. GAA. GAG. TCT. CTA. CAC. AGT. CCG. TAC. CCT. GAC. TAC. CAT
 Lys-Met-Ala-Gly-Asp-Pro-Arg-Tyr-Glu-Glu-Ser-Leu-His-Ser-Pro-Tyr-Pro-Asp-Tyr-His
 TGG. CTT. CGA. ACT. GTA. AAA. ACC. ACA. AAG. GAG. TCC. CTC. GTT. ATC. ATA. TCT. CCA. AGT. GTG. GTA
 Trp-Leu-Arg-Thr-Val-Lys-Thr-Thr-Lys-Glu-Ser-Leu-Val-Ile-Ile-Ser-Pro-Ser-Val-Val
 GAT. TTG. GAC. CCA. TAT. GAC. AAC. TCC. CTT. CAC. TCG. AGG. GTC. TTC. CCT. AGC. GGA. AAG. TGC. TCA
 Asp-Leu-Asp-Pro-Tyr-Asp-Asn-Ser-Leu-His-Ser-Arg-Val-Phe-Pro-Ser-Gly-Lys-Cys-Ser
 GGA. ATA. ACA. GTA. TCT. TCT. GTC. TAC. TGC. TCA. ACT. AAC. CAC. GAT. TAC. ACC. GTT. TGG. ATG. CCT
 Gly-Ile-Thr-Val-Ser-Ser-Val-Tyr-Cys-Ser-Thr-Asn-His-Asp-Tyr-Thr-Val-Trp-Met-Pro
 GAA. AGT. CTG. AGA. CTA. GGG. ACA. TCT. TGT. GAC. ATT. TTT. ACC. AAT. AGT. AGA. GGG. AAG. AGA. GTA
 Glu-Ser-Leu-Arg-Leu-Gly-Thr-Ser-Cys-Asp-Ile-Phe-Thr-Asn-Ser-Arg-Gly-Lys-Arg-Val
 TCC. AAG. GGG. AGC. AAG. ACC. TGT. GGC. TTT. GTA. GAT. GAA. AGA. GGC. CTA. TAT. AAG. TCT. CTA. AAA
 Ser-Lys-Gly-Ser-Lys-Thr-Cys-Gly-Phe-Val-Asp-Glu-Arg-Gly-Leu-Tyr-Lys-Ser-Leu-Lys
 GGC. GCA. TGC. AAA. CTC. AAG. TTG. TGT. GGA. GTT. CGT. GGA. CTT. AGA. CTT. ATG. GAC. GGA. ACA. TGG
 Gly-Ala-Cys-Lys-Leu-Lys-Leu-Cys-Gly-Val-Arg-Gly-Leu-Arg-Leu-Met-Asp-Gly-Thr-Trp
 GTC. GCG. ATG. CAG. ACA. TCA. AAT. GAG. ACC. AAA. TGG. TGT. CCT. CCC. GAT. CAG. TTG. GTT. AAT. CTG
 Val-Ala-Met-Gln-Thr-Ser-Asn-Glu-Thr-Lys-Trp-Cys-Pro-Pro-Asp-Gln-Leu-Val-Asn-Leu
 CAC. GAC. CTT. CGC. TCA. GAT. GAA. ATC. GAG. CAT. CTT. GTT. ATA. GAG. GAG. TTG. GTC. AAG. AAA. AGA
 His-Asp-Leu-Arg-Ser-Asp-Glu-Ile-Glu-His-Leu-Val-Ile-Glu-Glu-Leu-Val-Lys-Lys-Arg
 GAG. GAG. TGT. CTG. GAT. GCA. TTA. GAG. TCC. ATC. ATA. ACC. ACC. AAG. TCA. GTG. AGT. TTC. AGA. CGT
 Glu-Glu-Cys-Leu-Asp-Ala-Leu-Glu-Ser-Ile-Ile-Thr-Thr-Lys-Ser-Val-Ser-Phe-Arg-Arg
 CTC. AGT. TAT. TTA. AGA. AAA. CTT. GTC. CCC. GGG. TTC. GGA. AAA. GCA. TAT. ACC. ATA. TTC. AAC. AAG
 Leu-Ser-Tyr-Leu-Arg-Lys-Leu-Val-Pro-Gly-Phe-Gly-Lys-Ala-Tyr-Thr-Ile-Phe-Asn-Lys
 ACC. TTG. ATG. GAG. GCT. GAA. GCT. CAC. TAC. AAG. TCA. GTC. AGG. ACT. TGG. AAT. GAG. ATC. ATC. CCC
 Thr-Leu-Met-Glu-Ala-Glu-Ala-His-Tyr-Lys-Ser-Val-Arg-Thr-Trp-Asn-Glu-Ile-Ile-Pro
 TCA. AAA. GGA. TGT. TTG. AGA. GTT. GGA. GGG. AGG. TGT. CAT. CCT. CAT. GTA. AAC. GGG. GTG. TTT. TTC
 Ser-Lys-Gly-Cys-Leu-Arg-Val-Gly-Gly-Arg-Cys-His-Pro-His-Val-Asn-Gly-Val-Phe-Phe

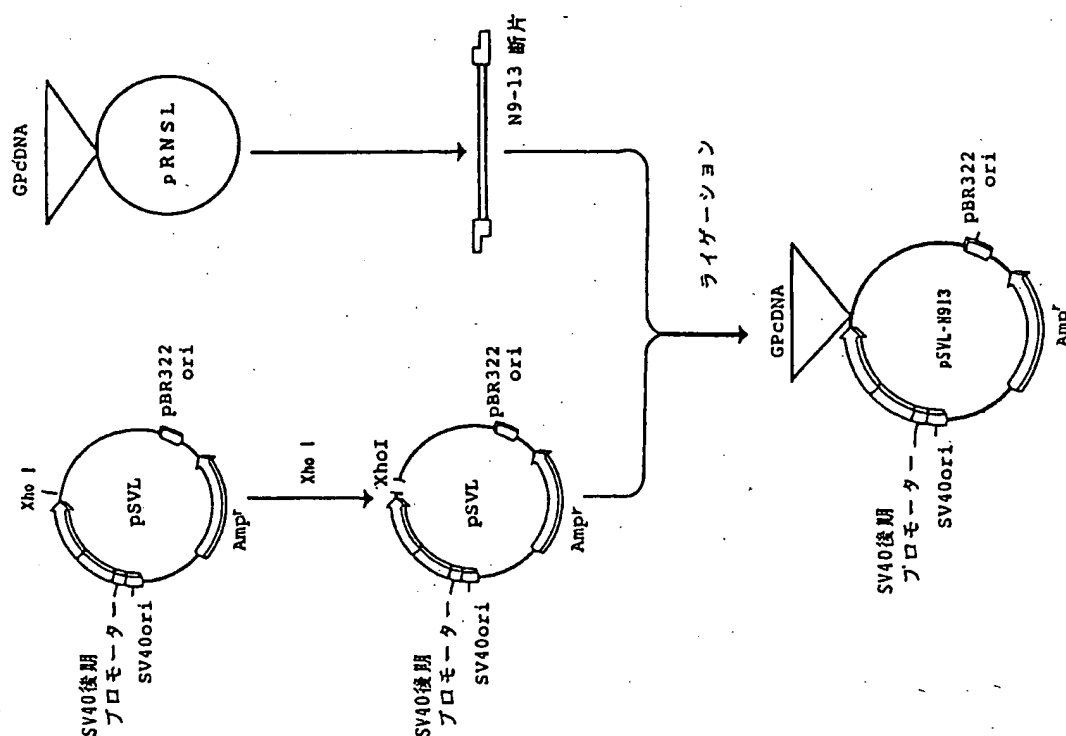
第 1 図 その 2

AAT. GGT. ATA. ATA. TTA. GGG. CCT. GAC. GGT. CAT. GTT. TTA. ATC. CCA. GAG. ATG. CAA. TCA. TCC. CTC
 Asn-Gly-Ile-Ile-Leu-Gly-Pro-Asp-Gly-His-Val-Leu-Ile-Pro-Glu-Met-Gln-Ser-Ser-Leu
 CTC. CAG. CAA. CAT. ATA. GAG. TTA. TTG. GAA. TCC. TCA. GTT. ATT. CCC. CTG. ATG. CAC. CCC. CTT. GCA
 Leu-Gln-Gln-His-Ile-Glu-Leu-Leu-Glu-Ser-Ser-Val-Ile-Pro-Leu-Met-His-Pro-Leu-Ala
 GAC. CCG. TTC. ACA. GTT. TTC. AAG. GAC. GGC. GAT. GAG. ACT. GAG. GAT. TTT. ATA. GAA. GTT. CAC. CTT
 Asp-Pro-Phe-Thr-Val-Phe-Lys-Asp-Gly-Asp-Glu-Thr-Glu-Asp-Phe-Ile-Glu-Val-His-Leu
 CCC. GAT. GTG. CAC. GAA. CAA. GTC. TCA. GGG. GTT. GAC. CTG. GGT. CTC. CCG. AAC. TGG. GGG. GAG. TAT
 Pro-Asp-Val-His-Glu-Gln-Val-Ser-Gly-Val-Asp-Leu-Gly-Leu-Pro-Asn-Trp-Gly-Glu-Tyr
 GTA. TTA. CTA. AGT. GCA. GGG. ACC. TTG. ATT. GCC. TTG. ATG. TTG. ATA. ATT. TTC. CTA. ATG. ACA. TGT
 Val-Leu-Leu-Ser-Ala-Gly-Thr-Leu-Ile-Ala-Leu-Met-Leu-Ile-Ile-Phe-Leu-Met-Thr-Cys
 TGT. AGA. AAA. GTC. GAT. CCG. CCA. GAA. TCT. ACA. CAA. CGC. AGT. CTC. AGA. GGG. ACA. GGA. AGG. AAT
 Cys-Arg-Lys-Val-Asp-Arg-Pro-Glu-Ser-Thr-Gln-Arg-Ser-Leu-Arg-Gly-Thr-Gly-Arg-Asn
 GTG. TCA. GTC. ACC. TCC. CAA. AGC. GGG. AAA. TTC. ATA. CCT. TCA. TGG. GAG. TCG. TAT. AAA. AGT. GGG
 Val-Ser-Val-Thr-Ser-Gln-Ser-Gly-Lys-Phe-Ile-Pro-Ser-Trp-Glu-Ser-Tyr-Lys-Ser-Gly
 GGT. GAG. ACT. GGA. CTG. TGA. AGA. TTT. GTC. ATC. TTT. TCG. ACG. CTT. CAA. GTT. CTG. AAG. ATA. ACC
 Gly-Glu-Thr-Gly-Leu-***
 TTC. CCT. CTA. AGC. TGG. GGG. GAA. TCT. CTG. AGT. TCA. ATA. GTC. CTC. CTT. GAA. CTC. CAT. TCA. ACA
 GGG. TGG. ATT. CAA. AAG. TCA. TGA. GAC. TTT. CAT. TAA. TCA. TCT. CAG. TTG. ATC. AAA. CAA. GGT. CAT
 GTA. GAT. TCT. CAT. AAT. TCG. GGA. AAT. CTT. CTA. GTA. GTT. TCA. GTG. ACC. GAC. AGT. GCT. TTC. ATT
 CCC. CAG. GAA. CTG. ATG. TCA. AAG. GTT. GTT. GAC. GGG. TCA. AGA. GGT. ATT. TCT. GAT. GAC. TCC. GTG
 CGT. GGG. CCC. GGA. CAG. AGG. TCA. TAG. TAC. GTC. CCA. TGA. TAG. CGG. ACT. CAG. CAT. GAG. TCG. ATT
 GAG. AAA. AGT. AAT. CTG. CCT. CCC. ATG. AAG. GAC. ACC. GGC. AAT. AAC. TCA. CAA. TCA. TCT. TGC. ATC
 TCA. GCG. AAG. TGT. GCA. TAA. TTA. TAA. AGG. GGC. TAG. ATC. ATC. TAA. GCT. TTT. CAG. TTG. AGA. AAA
 AAA. AAA. AAA. AAA. AAA. AAA. AAA.

第 2 図

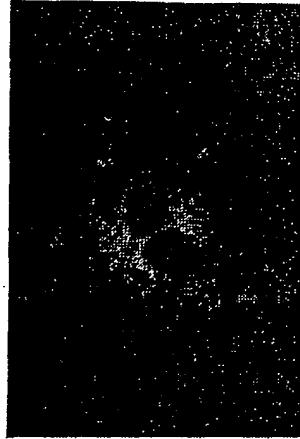


第 3 図

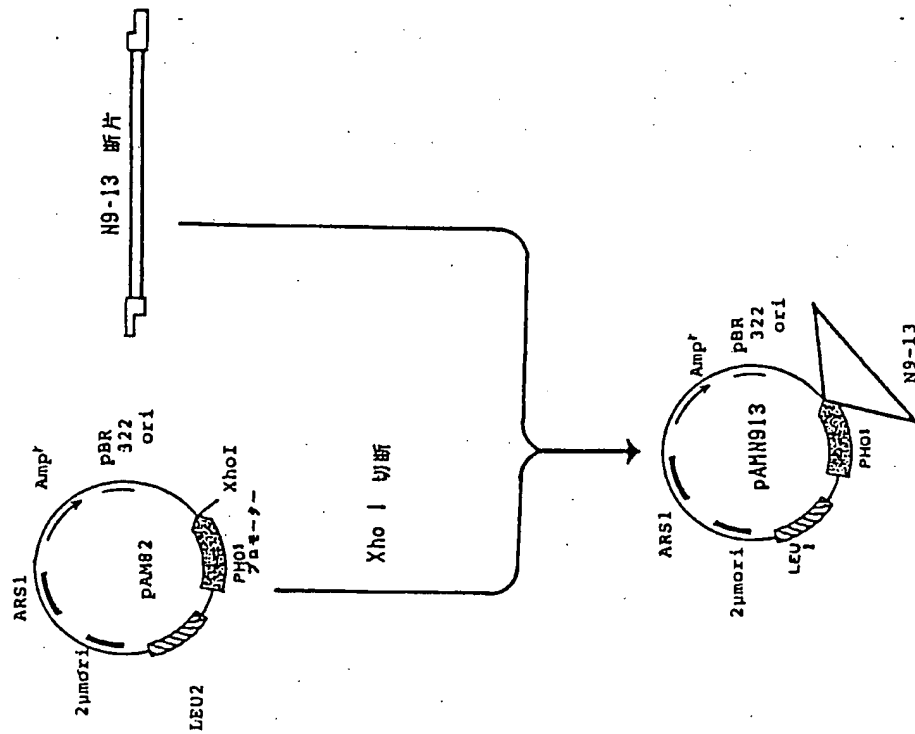


図面の浄写

第 4 図



第 5 図



手続補正 (方式)

昭和63年4月21日

特許庁長官 小川 邦夫 殿

1. 事件の表示

昭和62年 特願 第330896号

2. 発明の名称

狂犬病ウイルス糖蛋白質をコードする遺伝子断片およびこれを用いた狂犬病ウイルス糖蛋白質の製法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 熊本県熊本市清水町大塚668番地

名称 財団法人 化学及血清療法研究所

代表者 野中 實男

4. 代理人

住所 熊本県熊本市清水町大塚668番地

財団法人 化学及血清療法研究所内

〒860 電話 096(344)1211

氏名 弁理士(8767) 筒井

5. 補正命令の日付

昭和63年3月29日(発送日)

6. 補正の対象

明細書の図面の簡単な説明の欄、および

図面(第4図)

7. 補正の内容

(1) 明細 第47頁8~10行目、図面の簡単な説明の欄における第4図の説明を、次のように補正する。

「第4図は、COS細胞内で発現された狂犬病G蛋白を蛍光反応で示したCOS細胞(生物)の形態を示す蛍光顕微鏡写真(200倍)である。」

(2) 第4図を別紙のとうり補正する。